

اسرار - مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ، درمانی
سبزوار () سال پنجم / شماره 1 / بهار 1377

تولید آنتی‌بادی ضد مرفین

دکتر عظیم اکبرزاده *

برای تولید آنتی‌بادی ضد مرفین، ابتدا مرفین به مرفین سوکسینات تبدیل و سپس به آل‌بومین سرم گاو متصل شد. در این تحقیق 8/2 مل‌کول مرفین سوکسینات به هر مل‌کول آل‌بومین سرم گاو متصل؛ و سپس ایمنوژن تهیه شده به صورت عضلانی به خرگوش تزریق شد. سه تزریق یادآوری در هفته‌های 4 ، 12 ، 21 نیز به صورت عضلانی تزریق شد. بعد از گذشت این زمان، از حیوان جهت بررسی وجود آنتی‌مرفین خون گرفته شد. روش بررسی وجود فعالیت آنتی‌مرفین آنزیم ایمنواسی بود. بعد از حصول اطمینان از تولید آنتی‌مرفین برای خالص‌سازی آنتی‌بادی ضد مرفین، از روش افینیتی کروماتوگرافی استفاده شد. بعد از خالص‌سازی مشخص شد که آنتی‌بادی خالص شده، 25 بار بیشتر از سرم تخلیص نشده فعالیت نشان می‌دهد. واژه‌های کلیدی : آنتی‌بادی ضد مرفین ، آل‌بومین ، مرفین سوکسینات .

مقدّمه	آنتی‌بادی ضد مرفین
یکی از ارکان اساسی برای ساخت کیت تشخیص مرفین در مایعات بیولوژیک به روش ایمنواسی تهیه	است (2 و 8) . از آنجا که مراکز پژوهشی در ایران، در راستای ساخت و تولید این کیت تلاش می‌کنند؛ تصمیم به تولید و

خالص‌سازي و آنتي‌بادي
ضد مرفين گرفته شد.

سابقه توليد
آنتي‌بادي ضد مرفين
در دنيا، به اوایل
دهه

هفتاد ميلادي
برمي‌گردد (1). البته
از اين آنتي‌بادي
براي اهداف پژوهشي
مختلف، مانند تعيين
محل قرارگيري رسپتور
مرفين در بدن انسان
و يا تشخيص مرفين در
مايعات بيولوژيك
استفاده شده است (6)
و (8). لازم به
يادآوري است كه با
وجود آن كه هدف
نخستين ما از توليد
و خالص‌سازي آنتي‌بادي
ضد مرفين، استفاده
از آن براي ساخت كيت
تشخيص مرفين است ولي
در نظر است كه در
آينده بر روي
پاسخ‌هاي ايمنولوژيك
حيوانات ايمن شده با

مرفین، بررسی
بیشتری به عمل آید.

والکر و همکاران
(11) انجام شد.

روش پز و هش

ساخت ایمنوژن

مرفین توسط روش
سیمون و همکاران
(10) به مرفین - 6-
همی سوکسینات تبدیل
شد. منتهی برای بالا
بردن راندمان مدت
زمان عکس العمل یا
فعالیت لازم به مدت 2
ساعت افزایش داده
شد، سپس مرفین
سوکسینات تولید شده
توسط روش پارکر و
همکاران (9) به
آلبومین سرم گاو
متصل شد.

ایمونیزاسیون

ایمونیزاسیون با
استفاده از روش

برای بررسی
وجود آنتیبادی ضد
مرفین

از روش آنزیم
ایمنواسی
استاندارد

(تکنیک ELISA)
استفاده شد .

بررسی وجود آنتیبادی

برای بررسی وجود
آنتیبادی ضد مرفین
از روش آنزیم
ایمنواسی
استاندارد (تکنیک
ELISA) استفاده شد.
در این روش، کونژوگه
آنتیبادی متصل به
آنزیم پنیسیلیناز به
عنوان آنتیبادی
ثانویه به کار رفت.

تهیه آنتیژن پوششی

برای سنجش وجود
فعالیت آنتی‌مرفین با
استفاده از روش
آنزیم ایمنواسی و
تکنیک الیزا؛ لازم
است ابتدا ایمنوژن
در ته پلیت پوشانده
شود. از آنجا که
احتمال دارد فعالیت
ضد آلبومین سرم گاو
در سرم وجود داشته
باشد؛ لذا برای
تهیه آنتیژن جهت
پوشاندن پلیت
الیزا از اتصال
مرفین - 6 -
همی‌سوکسینات به
آلبومین تخم‌مرغ
استفاده شد.

برای راه‌اندازی
تکنیک الیزا لازم است
میزان مطلوب آنتیژن
پوششی مشخص گردد.
برای این منظور از
Chesser Board
استفاده شد (7). به
این صورت که
میزان‌های متفاوت از
آنتیژن در ته پلیت
پوشانده شد و روی آن
در نوبت‌های متفاوت
سرم اضافه گردید.

برای این منظور
ایمنوژن در غلظت‌های
1 ، 2 ، 5 ، 10
میکروگرم در صد
میکرولیت‌ر بافر فسفات
10 میلی‌مولار در ته
پلیت پوشانده شد و
بعد از یک شب
انکوباسیون در 37
درجه پلیت شستشو
داده شد. سپس برای
پر کردن محلهای خالی
از محلول 5 ژلاتین به
میزان 200 میکرولیت‌ر
برای هر خانه پلیت و
به مدت یک ساعت
استفاده شد. سپس 100
میکرولیت‌ر سرم در
رقت‌های 50:1 ، 100:1 ،
400:1 و 800:1 در
بافر فسفات 10 میلی
مولار که 1 درصد
ژلاتین دارد تهیه و
بعد از زمان
انکوباسیون به هر
چاهک اضافه، و سپس
پلیت بعد از یک ساعت
انکوباسیون در 37
درجه شستشو داده شد.
در نهایت 100
میکرولیت‌ر سوبسترای
آنزیم پنی‌سیلیناز که
پنی‌سیلین V است با

غلظت 0/28 میلی گرم
در میلی لیتر به هر
چاهک اضافه شد. بعد
از یک ساعت
انکوباسیون در 37
درجه به چاهکها
محلول رنگی اضافه
شد. این محلول رنگی
برای آنزیم
پنی سیلیناز ید در
نشاسته است که در
صورت وجود فعالیت
آنزیمی سوبسترا
شکسته شده و ید
موجود در یدور احیاء
می گردد. رنگ محلول
رنگی از آبی به
بی رنگ تبدیل می شود.
سرانجام 5 دقیقه بعد
از افزودن محلول
رنگی نتیجه
توسط دستگاه
ELISA READER در طول
موج 620 نانومتر
قرائت شد.

تعیین عیار آنتی بادی در سرم

ابتدا ژن پوششی در
ته خانه های پلیت
قرار می گیرد. بعد از
یک شب انکوباسیون
پلیت ها 3 بار شستشو
داده می شوند و

رقتهای مختلفی از
سرم 400:1 ، 800:1 ،
1600:1 و 3200:1 به آن
اضافه شد و بقیه
مراحل مانند روش
Chesser Board که در
بالا شرح داده شده
است، ادامه یافت.

فعال سازی سفاروز

فعال سازی سفاروز
B4 به روش مارچ و
همکاران (7) انجام
شد، سپس به ژل فعال
شده آمینوهگزان به
روش کواتری کیس و
همکاران (4) متصل
گردید. در نهایت
آنتی ژن به
آمینوهگزان سفاروز
B4 با استفاده از
روش سیمون و همکاران
(10) اتصال داده شد.

آماده سازی سرم برای تخلیص

ابتدا گامابولین
سرم توسط آمونیوم
سولفات اشباع با
استفاده از روش
کامیبل و همکاران
(5) رسوب داده شد.
بعد از یک هفته

دیالیز در مجاورت
بافر فسفات با $\text{PH}=7.2$
یک شب دیگر در
مجاورت بافر فسفات
با $\text{PH}=6.3$ که $1/44$
مولار کلرید سدیم
داشت دیالیز گردید.

نمونه‌گذاری و انجام کروماتوگرافی

ستونی که انتخاب
شد 10×0.5
سانتیمتر و میزان ژل
متراکم شده داخل آن
5 میلی‌لیتر بود. قبل
از شروع کار لازم بود
تا سدیم آزایدژل،
توسط 50 میلی‌لیتر
محلول 1 مولار کلرید
سدیم و سپس با 1
لیتر بافر فسفات
 $\text{PH}=7.2$ شسته شود.
کروماتوگرافی به روش
والکر و همکاران (3
و 11) و با همان
محلولهای مصرفی توسط
آنها انجام شد و
فراکسیونهایی به حجم
یک میلی‌لیتر جمع‌آوری
گردید.

بررسی وجود فعالیت
آنتی‌بادی در فراکسیونهای
جمع‌آوری شده

فراکسیونهای
جمع‌آوری شده که
دارای جذب نوری در
طول موج 280 نانومتر
بود؛ با هم مخلوط
شد. سپس در مجاورت
آب مقطر به مدت 48
ساعت دیالیز شد. بعد
از دیالیز، تغلیظ و
لیوفیلیز شد و در
نهایت به همان روش
که برای تعیین تیتراژ
سرمی انجام شد وجود
فعالیت آنتی‌مرفین در
آن کنترل شد.

روش بررسی میزان تخلیص

جهت بررسی میزان
تخلیص از مقایسه
فعالیت سرم تخلیص
شده بعد از لیوفیلیز
کردن استفاده شد.
روش بررسی فعالیت
آنزیم ایمونواسی با
استفاده از تکنیک
الیزا به همان روشی
که برای تعیین
فعالیت در
فراکسیونها انجام
شده بود استفاده
گردید. منتهی به جای
سرم رقّتی معادل 10 ،
2 ، 0/4 ، 0/8 ، 0/16

و 0/0032 میکروگرم
در بافر فسفات از
فراکسیونها تهیه و
به چاهکها اضافه شد.

یا فته ها

در این بررسی
کنترل صحت سنتز

مرفین 6 -

همی سوکسینات، مطابق
روش سیمون و همکاران
(10) کنترل شد.

کنترل میزان هاپتن
متصل شده به آلبومین
حامل، با استفاده از
تعیین ضریب خاموشی

مرفین 6 -

همی سوکسینات مشخص شد
که به طور متوسط 8/2

مولکول مرفین 6 -

همی سوکسینات به هر
مولکول آلبومین سرم
گا و 8/5 مولکول

مرفین 6 -

همی سوکسینات

آنتیبادی خالص شده،
25 بار بیشتر از سرم

تخلیص نشده فعّالیّت
نشان می دهد .

به هر مولکول
آلبومین تخم مرغ متصل
شده است. از نتایج
Chesser Board مشخص شد
که بهترین جواب با
غلظتهای 1 و 2

میکروگرم از مرفین 6
- همی سوکسینات متصل
به آلبومین تخم مرغ
در 100 میکرولیتر
بافر فسفات حاصل
می شود و مشخص شد که
تا تیتراژ 3200:1
آنتیبادی در سرم هر
حیوان مثبت است.

در بررسی جذب نوری
فراکسیونهای جمع آوری
شده در طول موج 280
نانومتر بعد از
کروماتوگرافی و شستن
ستون لوله های شماره
1 ، 2 ، 3 و 4 که

دارای جذب نوری
بودند، جمع آوری،
تخلیص، لیوفیلیزه و
در 20- درجه

سانتیگراد نگهداری
می شود، که در مقایسه
آن با سرم لیوفیلیزه
شده مشخص شده 25
بار نسبت به سرم
فعّالتر است.

ساخت کیت تشخیص
مرفین استفاده کرد.

بحث

نکته قابل توجه
دیگر آن است که
آنزیمی که اکثراً در
روش آنزیم ایمنواسی
قرار می‌گیرد
پراکسیداز است ولی
در این تحقیق از
آنزیم پنی سیلیناز
به علت دارا بودن
مزیت‌هایی از قبیل
بالا بودن کینیتیک
آنزیمی و ارزان بودن
آن نسبت به آنزیم
پراکسیداز مورد
استفاده قرار گرفت.

یکی از نکاتی که
لازم به یادآوری است،
در فراکسیون‌های
جمع‌آوری شده حاصل از
شستن ستون توسط بافر
فسفات سالین فعالیت
آنتی‌مرفین مشاهده شد
ولی از آنجا که بافر
فسفات سالین عاملی
جهت شستن عوامل
پیوند نشده و عواملی
است که به صورت
غیراختصاصی وصل
شده‌اند بنابراین
وجود این فعالیت در
فراکسیون حاصل از

تجزیه و تحلیل
نتایج این بررسی
نشان می‌دهد که با
توجه به این که
آنتی‌بادی تولید شده
از تیترا بالایی
برخوردار است و در
روش آنزیم ایمنواسی
هنگامی که پروتئین
حامل عوض می‌شود،
یعنی به جای آل‌بومین
سرم گاو از آل‌بومین
تخم‌مرغ استفاده شود،
تفاوت بین اولین
تیترا سرمی و جذب
غیراختصاصی (NSB)
وجود دارد بنابراین
روش تبدیل آنتی‌ژن به
ایمنوژن روش مناسبی
است و کلاً در پروسه
تبدیل کونژوگاسیون
اپی‌توپ مشترک به
وجود نیامده است.
لذا به راحتی با روش
آنزیم ایمنواسی
تعیین عیار آنتی‌بادی
در سرم قابل
اندازه‌گیری است و به
این جهت از این
آنتی‌بادی می‌توان در

شستن ستون با بافر فسفات احتمالاً به علت زیادتر بودن میزان نمونه از ظرفیت ستون است.

Abstract

The production of the Anti - morphine Antibody

In order to produce Anti - morphine Antibody , we , first of all , converted the morphine to the Soxinate Morphine and then we attached it to the cows serum albumin . In this research , 8.2 molecules of the Soxinate Morphine were attached to each molecule of the cow's serum albumin and then the developed immuno - gene was injected intramuscularly to the rabbits. Three booster injections were also carried out intramuscularly within the 4th , 12th and the 21st weeks. After the elapse , blood was taken out of the animal's body for investigation in to existence of Anti - morphine . The method used to investigate the activatedness of the Anti - morphine was to use the Immuno . A . C . After obtaining assurances about the affinity chromatography method was used in order to purificate the Anti - morphine antibody . After the purification was carried out , it was recognized that the purificated antioy showed a sort of activity which was 25 times more effective than the unreleased serum .

Key words : Anti - morphine Antibody , Soxinate
Morphine .

منابع

- 1 - Alder F . L . & ET . AL , J . IMM . 106 . 1971 . pp 1686 - 1884 .
- 2 - Boulard , ch . & ET . AL . J . IMM . MET . 50 . 1982 . pp 221 - 226 .
- 3 - Catty D .(ed) . antibodies . 1 (2) . 1990 . pp 97 - 154 .
- 4 - Cuatre cases . P . & ET . AL , affinity choromatography , met . enz . 21 . 1970 . 345 - 378 .
- 5 - Campbell D . M . & ET . AL . amonium sulfate precipitation , MET . IMM . 1970 . pp 189 - 191 .
- 6 - John , M . Krola . journalof analitical toxicology . 16 . 1992 . pp 172 - 175 .
- 7 - March S . C . & ET . AL . a simplified methods for cyanogen bromide activation of agarose for affinity choromatography . 60 . 1974 . pp 149 - 152 .
- 8 - Nerenberg , S . T . & et . al . 24 . 1978 . pp 19 - 24 .
- 9 - Parker , c . Morphine radiolImmunoassay . Scl . 168 . 1970 . pp 1347 - 1348 .
- 10 - Simon E . J . & ET . AL . coupling of a new active morphine derivate to sepharose for affinity choromatography . Proc . Nat . Acad . Scl - usa 69 (7) . 1972 . 1835 - 1837 .

11 - (a) Walker , M . D . & ET . AL . "The purification of antimorphine antibodies by affinity" choromatography". J . pharm . EXP . THER . 203 (2) . 1977 . pp 360 - 364 .